

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun salam yang diambil di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional Tawangmangu (BBPPTOOT), Karanganyar, Jawa Tengah.

2. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun salam (*Syzygium polyanthum* [Wight]Walp.) yang dibuat sediaan salep dengan variasi konsentrasi ekstrak 1,25%, 2,5% dan 5%.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama dalam penelitian adalah sediaan salep ekstrak daun salam terhadap bakteri *S.aureus* yang diinfeksi pada kulit punggung kelinci.

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah sediaan salep ekstrak daun salam dengan variasi konsentrasi 1,25%, 2,5% dan 5%.

Variabel utama ketiga dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri sediaan salep ekstrak daun salam terhadap bakteri *S.aureus* yang diinfeksi pada kelinci dilihat dari kesembuhan infeksi dengan pengamatan hilangnya eritema dan tidak adanya nanah.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang telah diidentifikasi terlebih dahulu dapat diklasifikasi ke dalam berbagai macam yaitu variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkendali. Variabel bebas adalah variabel yang sengaja di ubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variasi konsentrasi salep ekstrak etanol daun salam (*Syzygium polyanthum* [Wight] Walp).

Variabel tergantung adalah titik pusat persoalan yang merupakan kriteria penilaian. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah aktivitas penyembuhan pada kulit punggung kelinci yang diinfeksi oleh bakteri *S.aureus* yang diberi salep ekstrak etanol daun salam (*Syzygium polyanthum* [Wight] Walp).

Variabel terkontrol adalah variabel yang mempengaruhi variabel terikat sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil diperoleh tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara tepat. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah bakteri *S.aureus*, media, sterilisasi, kondisi fisik uji yang meliputi: berat badan, usia dan jenis kelamin, tempat infeksi, temperature, makanan dan minuman tikus, proses pembuatan sediaan salep, penelitian dan laboratorium meliputi kondisi alat bahan yang digunakan harus steril.

Variabel terikat adalah titik pusat permasalahan yang merupakan pilihan dalam penelitian. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri yang mengakibatkan infeksi pada kulit kelinci dilihat dari lama waktu kesembuhan yang ditandai dengan hilangnya eritema dan tidak adanya nanah.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun salam adalah daun yang berwarna hijau masih segar dan bebas dari penyakit, daun salam diambil dari BBPPTO (Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional) Tawangmangu

Kedua, serbuk simplisia daun salam adalah daun salam yang telah dikeringkan dan diserbuk menggunakan ayakan no 60.

Ketiga, ekstrak etanol daun salam adalah ekstrak kental hasil remaserasi daun salam dengan pelarut etanol 70 %.

Keempat, salep ekstrak etanol daun salam adalah ekstrak daun salam yang dibuat dengan basis salep vaselin alba dan adeps lanae dengan variasi dosis yang berbeda.

Kelima, bakteri uji *S.aureus* adalah bakteri yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta.

Keenam, variasi konsentrasi ekstrak etanol daun salam yang digunakan adalah sebesar 1,25%, 2,5% dan 5%.

Ketujuh, uji aktivitas antibakteri secara *In Vivo* adalah uji daya penyembuhan terhadap pertumbuhan bakteri *S.aureus* yang diinfeksi secara subkutan, kemudian dibalut perban steril dan dibiarkan selama 48 jam hingga terjadi infeksi kemudian di oleskan dengan sediaan salep ekstrak etanol daun salam.

Kedelapan, kesembuhan adalah proses sembuhnya kelinci dari mengecilnya eritema dan menghilangnya nanah dalam hitungan hari yang diukur menggunakan jangka sorong atau penggaris.

Kesembilan, persen kesembuhan adalah persentase perhitungan dari rata-rata diameter eritema pada punggung kelinci yang diukur selama 14 hari, dimana hasil pada hari ke-n dibagi hari sebelumnya dikalikan 100%.

C. Bahan, Alat dan Hewan uji

1. Bahan

Bahan sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daun salam (*Syzygium polyanthum* [Wight] Walp.) yang diperoleh dari daerah Tawangmangu, MgSO₄, HCl pekat, HCl 2N, FeCl₃, pereaksi Mayer, pereaksi Bouchardat, pereaksi Dragendorf, media Nutrient Agar, media Brain Heart Infusion, media VJA, bakteri *S. aureus*, Kalium tellurite, Kristal violet, Lugols Iodine, Safranin, Hydrogen peroxyda, Asam sitrat, Vaseline putih, Adeps lanae, Salep Gentamisin sulfat 0.1%.

2. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi timbangan analitik (Ohaus), tabung reaksi, cawan petri, cawan porselin, pipet ukur, Erlenmeyer, waterbath, batang pengaduk, pipet ukur (Pyrex), gelas kimia (Pyrex), labu ukur (Pyrex), kapas lidi steril, jarum ose, lampu spiritus, pipet volum (Pyrex), autoklaf, incubator, beaker glass (Pyrex), mortir, stamper, wadah, stopwatch, viscometer (Rion CO), seperangkat alat uji daya sebar, obyek glass, *deck glass*, mikroskop, arloji, pH meter (Eutuch), mesh no. 60, kertas saring, *rotary evaporator* (Heidolph-Heisbad Hb Digit), oven (Memmert), dan alat destilasi Bidwell-Sterling.

3. Hewan uji

Hewan uji yang digunakan yaitu kelinci *New Zealand* berkelamin jantan umur 5,0 – 6,0 bulan, berat 1,5 – 2,0 kg yang telah diadaptasikan selama 5 hari.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Determinasi tanaman merupakan tahap pertama dalam penelitian ini adalah menetapkan kebenaran sampel tanaman daun salam (*Syzygium polyanthum* [Wight.] Walp.) dengan cara mencocokkan ciri-ciri makroskopis dan morfologi yang ada dalam tanaman yang akan diteliti dengan kunci determinasi untuk menghindari kesalahan dari

tanaman yang akan digunakan untuk penelitian. Determinasi dilakukan di UPT Laboratorium Herbal Materia Medica Batu, Kabupaten Pasuruan Kota Malang.

2. Pengambilan dan pemilihan bahan

Daun salam (*Syzygium polyanthum* [Wight.] Walp.) diambil di BBPPTOOT Tawangmangu, Jawa Tengah. Daun salam dibersihkan dengan menggunakan air mengalir agar menghilangkan kotoran-kotoran lain yang melekat pada daun salam. Daun salam yang telah dibersihkan dilanjutkan dengan proses pengeringan menggunakan oven pada suhu 50°C selama dua hari. Pengeringan dilakukan untuk mengurangi kadar air pada daun salam sehingga mengurangi bahkan mencegah pembusukan yang disebabkan oleh mikroorganisme. Bahan yang sudah dikeringkan lebih mudah dihaluskan menjadi serbuk (Sayuti, 2015).

3. Pembuatan serbuk

Daun salam yang telah dikeringkan, kemudian diserbuk dengan menggunakan blender lalu diayak dengan menggunakan ayakan no 60 sampai serbuk terayak habis. Hasil serbuk tersebut disimpan dalam wadah kering dan tertutup rapat. Kemudian dilakukan persentase bobot kering terhadap bobot basah.

4. Penentuan kadar air serbuk daun salam

Penentuan kadar air dilakukan dengan metode thermovolumetri. Serbuk daun salam masing-masing ditimbang 20 gram. Serbuk yang telah ditimbang dimasukkan ke dalam labu ukur dan ditambahkan xylen sebanyak 125 ml atau hingga seluruh bahan terendam. Rangkaian alat destilasi *Bidwell-Sterling* dipasang dan api dinyalakan untuk memanaskan. Pemanasan dihentikan jika sudah tidak ada lagi air yang mengalir ke dalam tabung *receiver* kemudian membaca skala volume air yang terdestilasi.

5. Pembuatan ekstrak etanol daun salam

Pembuatan ekstrak daun salam menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70% dengan perbandingan bahan dan pelarut 1:10 bagian. Serbuk daun salam ditimbang sebanyak 1.000 gram masukkan ke dalam botol maserasi ditambahkan pelarut 70% sebanyak 10.000 mL direndam selama 6 jam sambil diaduk-aduk kemudian diamkan selama 24 jam. Setelah itu maserat dipisahkan dengan cara disaring dengan kain flanel steril, ampas diperas. Ulangi proses penyarian dengan etanol 70% sebanyak 5000 ml untuk mencuci sisa

ekstrak yang tertinggal dibotol. Maserat dikumpulkan dan dikentalkan di evaporator dengan suhu 40°C hingga diperoleh ekstrak kental. Rendemen yang diperoleh ditimbang dan dicatat (BPOM, 2004).

6. Identifikasi kandungan kimia ekstrak etanol daun salam

6.1 Identifikasi senyawa flavonoid. Identifikasi flavonoid dilakukan dengan memasukkan 1 g ekstrak kental yang sudah dilarutkan dengan aquadest panas sebanyak 10 ml pada tabung uji, tambahkan 0,1 gram serbuk magnesium lalu tambahkan 10 tetes asam klorida pekat, jika terbentuk warna merah jingga sampai merah ungu menunjukkan adanya flavonoid dan jika terbentuk warna kuning jingga menunjukkan adanya flavon, kalkon, dan auron (Kemenkes RI, 1989).

6.2 Identifikasi senyawa saponin. Ekstrak kental sampel sebanyak 1 g diencerkan dengan aquadest panas sebanyak 10 ml, lalu dikocok kuat-kuat selama 10 detik, yang kemudian terbentuk buih yang stabil selama tidak kurang dari 10 menit. Lalu pada penambahan 1 tetes asam klorida 2 N, buih tidak hilang yang artinya sampel ini positif mengandung saponin (Kemenkes RI, 1989).

6.3 Identifikasi senyawa tanin. Identifikasi tanin dilakukan dengan cara sampel serbuk dan ekstrak masing-masing sebanyak 0,1 g ditambahkan 10 ml aquadest panas, di didihkan selama 5 menit, larutan disaring dan filtratnya ditambahkan feri klorida (FeCl_3) 1%. Hasil positif adanya tanin ditunjukkan dengan terbentuknya warna hijau kehitaman (Nugrahani *et al.*, 2016).

6.4 Identifikasi senyawa alkaloid. Identifikasi alkaloid dilakukan dengan menimbang ekstrak kental sebanyak 0,5 gram, tambahkan 1 ml asam klorida 2N dan 9 ml aquadest lalu panaskan diatas penangas air selama 2 menit, dinginkan lalu disaring. Siapkan 3 tabung reaksi lalu masukkan 3 tetes filtrat dan tambahkan 2 tetes pereaksi yaitu Mayer pada tabung 1, Bouchardat pada tabung 2, dan Dragendorf pada tabung 3. Hasil positif jika terbentuk endapan putih pada pereaksi Mayer, endapan coklat pada pereaksi Bouchardat, dan endapan merah jingga pada pereaksi Dragendorf (Kemenkes RI, 1989).

7. Pembuatan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus*

Bakteri uji *S.aureus* yang dibiakan di media *nutrient agar* (NA) diambil 2 ose atau lebih dan ditanam pada tabung yang berisi media *Brain Heart Infusion* (BHI) lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C, kekeruhannya disesuaikan dengan kekeruhan standar Mc Farland 0,5 setara dengan jumlah $1,5 \times 10^8$ cfu/mL. Tujuan disesuaikan

suspense bakteri *S.aureus* dengan Mc Farland 0,5 yaitu agar jumlah bakteri yang digunakan sama selama penelitian dan mengurangi kepadatan bakteri saat pengujian.

8. Identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus*

Identifikasi bakteri *S.aureus* dilakukan dengan cara menginokulasi bakteri uji pada medium VJA yang sebelumnya sudah ditambahkan kalium tellurite 1% kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil pada bakteri *S. aureus* menunjukkan koloni berwarna hitam dan warna medium di sekitar berwarna kuning keemasan.

8.1 Identifikasi pewarnaan Gram. Pewarnaan Gram pada bakteri *S. aureus* dengan cara membuat preparat apus bakteri dengan mencampurkan satu usa biak bakteri dengan NaCl yang telah ditetaskan pada gelas obyek, kemudian dibuat apus setipis mungkin, dikeringkan, dan difiksasi di atas lampu spiritus. Preparat apus kemudian ditambahkan Kristal Violet sebagai pewarna utama, didiamkan kurang lebih 2 menit, dicuci dengan air mengalir dan ditetesi Lugols Iodine sebagai mordant, didiamkan kurang lebih 1 menit, kemudian preparat apus dilunturkan dengan alcohol 96%, diamkan selama 1 menit, dicuci dengan air mengalir lalu ditambahkan Safranin sebagai cat lawan atau penutup, didiamkan kurang lebih 1 menit, dan dicuci dengan air mengalir kemudian preparat dikeringkan di udara dan diamati di bawah mikroskop, menunjukkan hasil positif *S.aureus* apabila berwarna ungu, bentuk bulat dan bergerombol seperti anggur.

8.2 Identifikasi biokimia. Terbagi menjadi dua uji yaitu uji katalase dan uji koagulase. Uji katalase dilakukan dengan cara setetes larutan hydrogen peroksida 3% ditetaskan pada kaca objek dan sejumlah kecil pertumbuhan bakteri diletakkan pada larutan. Pembentukan gelembung (pelepasan oksigen) menunjukkan hasil tes positif.

Uji koagulase dilakukan dengan cara plasma kelinci (atau manusia) diberikan asam sitrat yang diencerkan 1:5 dicampur dengan volume yang sama, ditanamkan 1 ose biakan bakteri pada agar dan diinkubasi pada 37°C selama 24 jam, hasil tes adalah positif bila adanya gumpalan pada tabung.

9. Formulasi salep ekstrak etanol daun salam

Formulasi standar dasar salep yang digunakan menurut Agoes Goeswin (2006) adalah :

R/	Adaps lanae	15 g
	Vaselin	85 g
	m.f salep	100 g

Sediaan salep yang akan digunakan pada penelitian ini memiliki masing-masing konsentrasi ekstrak daun salam yaitu 1,25%, 2,5% dan 5% dibuat sebanyak 30 g.

Tabel 1. Formula salep ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum* [Wight] Walp.)

No.	Nama Bahan	Konsentrasi			
		F1 (gr)	F2 (gr)	F3 (gr)	F4(gr)
1.	Ekstrak daun salam	0,375	0,75	1,5	-
2.	Adeps lanae	4,442	4,386	4,274	4,498
3.	Vaselin putih	25,172	24,854	24,216	25,491
4.	Nipasol	0,01	0,01	0,01	0,01
	Bobot total	30	30	30	30

Keterangan :

F1 : Salep ekstrak daun salam 1,25%

F2 : Salep ekstrak daun salam 2,5%

F3 : Salep ekstrak daun salam 5%

F4 : Basis salep ekstrak daun salam

10. Pembuatan salep

Pembuatan salep ekstrak etanol daun salam dilakukan dengan metode peleburan. Semua bahan ditimbang sesuai formula kemudian mortar dan stamfer dihangatkan menggunakan air panas. Vaselin putih dan adeps lanae dilelehkan di atas water bath pada suhu 60°C hingga meleleh sempurna. Basis dituang ke dalam mortir hangat kemudian campur hingga homogen dan dibiarkan hingga dingin. Ekstrak etanol daun salam dimasukkan ke dalam basis salep dan diaduk hingga homogen. Salep kemudian dimasukkan ke dalam pot salep. Analisis dan simpulkan.

11. Pengujian mutu fisik sediaan salep

11.1 Uji organoleptis. Uji organoleptis dilakukan dengan cara pemeriksaan bentuk, warna dan bau.

11.2 Uji homogenitas. Uji homogenitas fisik dilakukan dengan cara sejumlah salep yang akan diamati dioleskan pada kaca objek yang bersih dan kering sehingga membentuk suatu lapisan tipis kemudian diamati. Salep dinyatakan homogen apabila pada pengamatan salep mempunyai tekstur yang tampak rata dan tidak menggumpal.

11.3 Uji viskositas. Uji viskositas salep dilakukan menggunakan alat viskotester. Bagian cup diisi dengan sediaan salep kemudian dilakukan penentuan viskositas dengan melihat jarum yang menunjukkan angka yang stabil dengan satuan dPas.

11.4 Uji pH. Pengujian pH dilakukan dengan salep sebanyak 1 gram dilarutkan dengan 10 ml aquadest, kemudian mencelupkan pH meter ke dalam sediaan pelarut. Catat hasil pH yang tertera (Suryani, 2015).

11.5 Uji daya sebar. Sebanyak 500 mg salep dan diletakkan diatas kaca bulat yang berdiameter 15 cm, kemudian kaca lainnya yang telah ditimbang terlebih dahulu diletakkan di atasnya dan dibiarkan selama 5 menit. Diamter sebar salep diukur dari empat sisi. Setelahnya, beban 50 gram kemudian 100 gram ditambahkan dan masing-masing didiamkan selama 5 menit lalu diukur dari empat sisi (Astuti *et al.*, 2010).

11.6 Uji daya lekat. Uji ini dilakukan dengan alat-alat seperti alat penguji daya lekat, dua objek glass, stopwatch, dan anak timbangan gram. Pengujian dilakukan dengan cara melekatkan salep secukupnya di atas objek gelas kemudian ditutup dengan objek gelas lain. Kedua objek gelas ditekan dengan beban 1000 gram selama 5 menit. Setelah 5 menit beban diangkat kemudian dicatat waktu saat kedua objek gelas tersebut lepas (Rahmawati *et al.*, 2010).

11.7 Uji stabilitas. Pengujian dilakukan dengan metode *Freeze thaw* dimana sediaan salep disimpan pada suhu kurang lebih 4°C selama 24 jam lalu dikeluarkan dan ditempatkan pada suhu kurang lebih 40°C selama 24 jam.

12. Perlakuan hewan uji

Hewan uji yang digunakan adalah kelinci putih *New zealand* yang diperoleh dari Abimanyu farm di Surakarta berumur 5,0 – 6,0 bulan, dengan berat badan 1,5–2,0 kg yang telah diadaptasikan selama 5 hari selama proses adaptasi dilakukan pengamatan kondisi umum dan penimbangan berat badan.

13. Pembuatan suspense bakteri

Pembuatan suspense dengan mengambil biakan murni kurang lebih 2 ose bakteri *S.aureus*. Suspensi dibuat dalam tabung yang berisi media *Brain Heart Infusion* (BHI) dan kekeruhannya disesuaikan dengan kekeruhan standar Mc Farland 0,5 setara dengan jumlah $1,5 \times 10^8$ cfu/mL. Tujuan disesuaikannya suspensi bakteri *S.aureus* dengan standar Mc Farland 0,5 yaitu agar jumlah bakteri yang digunakan sama selama penelitian dan terukur saat pengujian.

E. Pengujian Efek Antibakteri

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah kelinci jantan putih sebanyak 5 ekor dengan umur 5,0 - 6,0 bulan dengan berat

$\pm 1,5-2$ kg. Hewan uji kelinci yang sudah diaklimatisasikan selama 5 hari dicukur bulu pada punggung kelinci kemudian dipilih 6 lokasi yang akan disuntikkan suspensi bakteri dibagian kiri 3 lokasi untuk kelompok ekstrak, 2 lokasi sebelah kanan untuk kelompok kontrol positif dan negatif dan 1 lokasi sebelah kanan sebagai kontrol normal dengan jarak masing-masing lokasi ± 5 cm. Suspensi *S.aureus* diinfeksi secara subkutan sebanyak 0,2 ml pada masing-masing lokasi pada kulit punggung kelinci yang telah disiapkan. Salep diberikan setelah 48 jam pada daerah yang diinfeksi. Salep ekstrak etanolik daun salam dengan konsentrasi hambat minimum yang ditentukan dari hasil penelitian dioleskan sebanyak 3 kali pada 3 tempat di bagian kiri punggung kelinci, 2 lokasi di bagian kanan sebagai kontrol negatif dioleskan dengan basis salep, kontrol positif dioleskan dengan salep gentamisin, kontrol normal tanpa perlakuan. Oleskan salep ekstrak etanol daun salam dilakukan 3 kali sehari, pengamatan waktu penyembuhan infeksi berdasarkan hilangnya eritema, nanah (Naibaho *et al.*, 2013).

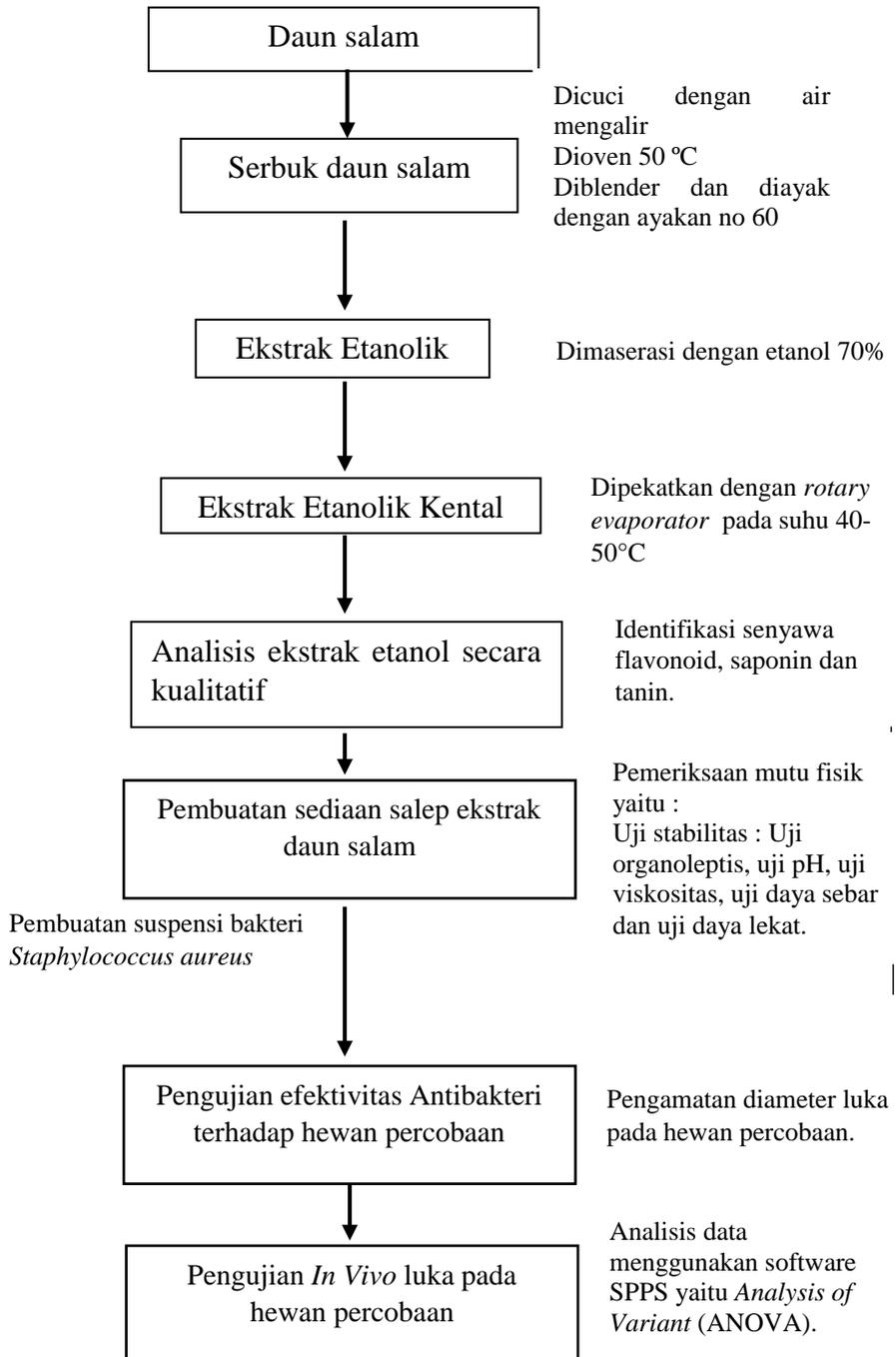
F. Pengamatan Pengujian Efek Antibakteri

Efek antibakteri dapat dilihat secara makroskopis dengan mengamati lamanya waktu penyembuhan infeksi dalam hitungan hari yang ditandai dengan hilangnya eritema dan nanah pada punggung kelinci (persen penyembuhan) yang diinfeksi *S.aureus* setelah pemberian salep ekstrak etanolik daun salam (Naibaho *et al.*, 2013).

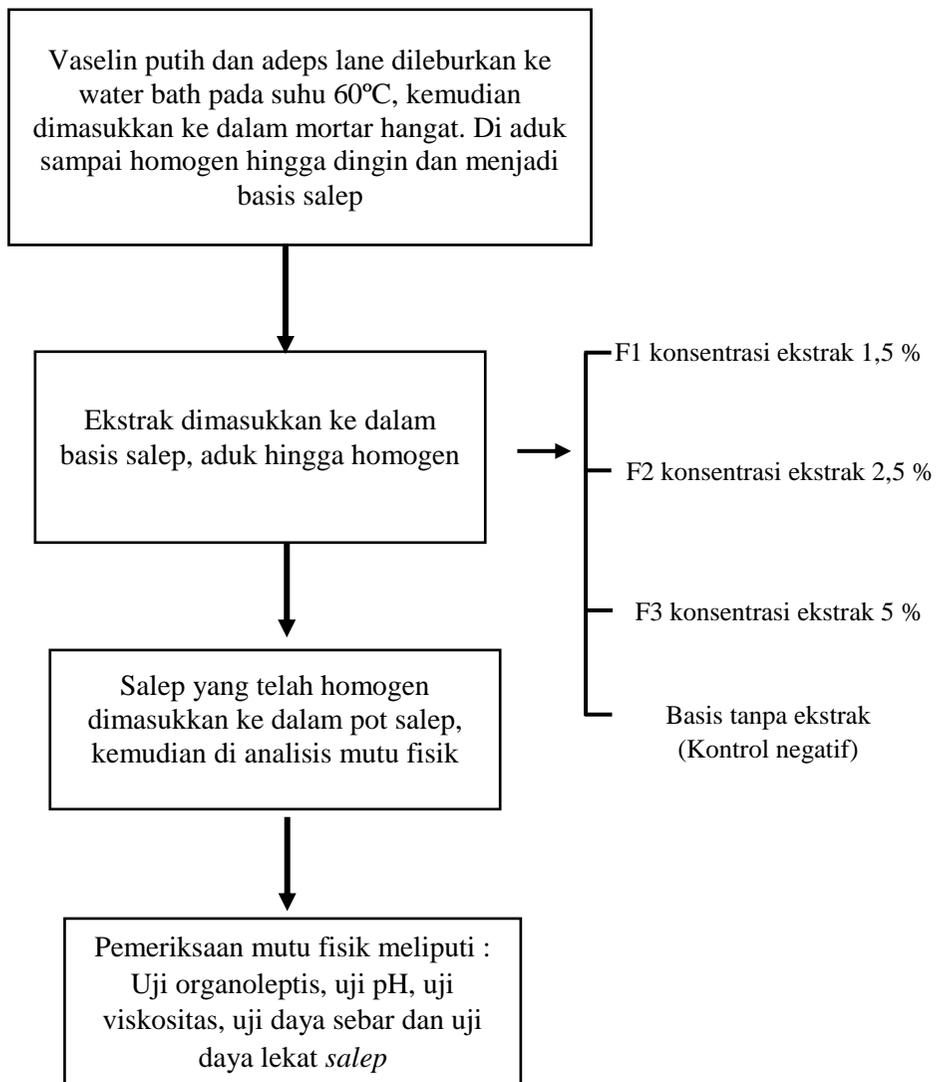
G. Analisis Data

Data hasil pengujian efek sediaan salep ekstrak etanol daun salam dengan menggunakan software SPSS pada konsentrasi yang sama untuk data hasil uji difusi dengan lamanya waktu penyembuhan dianalisis secara statistik menggunakan Metode *Shapiro wilk*. Hasil yang diperoleh jika terdistribusi normal ($p>0,05$) dilanjutkan dengan metode *Analysis of Varian* (ANOVA) satu jalan dengan taraf kepercayaan 95%. Lanjutkan dengan uji *Tukey* untuk mengetahui konsentrasi mana yang memiliki pengaruh sama atau berbeda antara satu dengan yang lainnya. Hasilnya jika tidak terdistribusi normal ($p<0,05$) maka dilanjutkan dengan uji *Kruskal-Wallis* dan dilanjutkan uji *Mann-Wilhitney* untuk mengetahui konsentrasi mana yang memiliki pengaruh sama atau berbeda antara satu dengan yang lainnya.

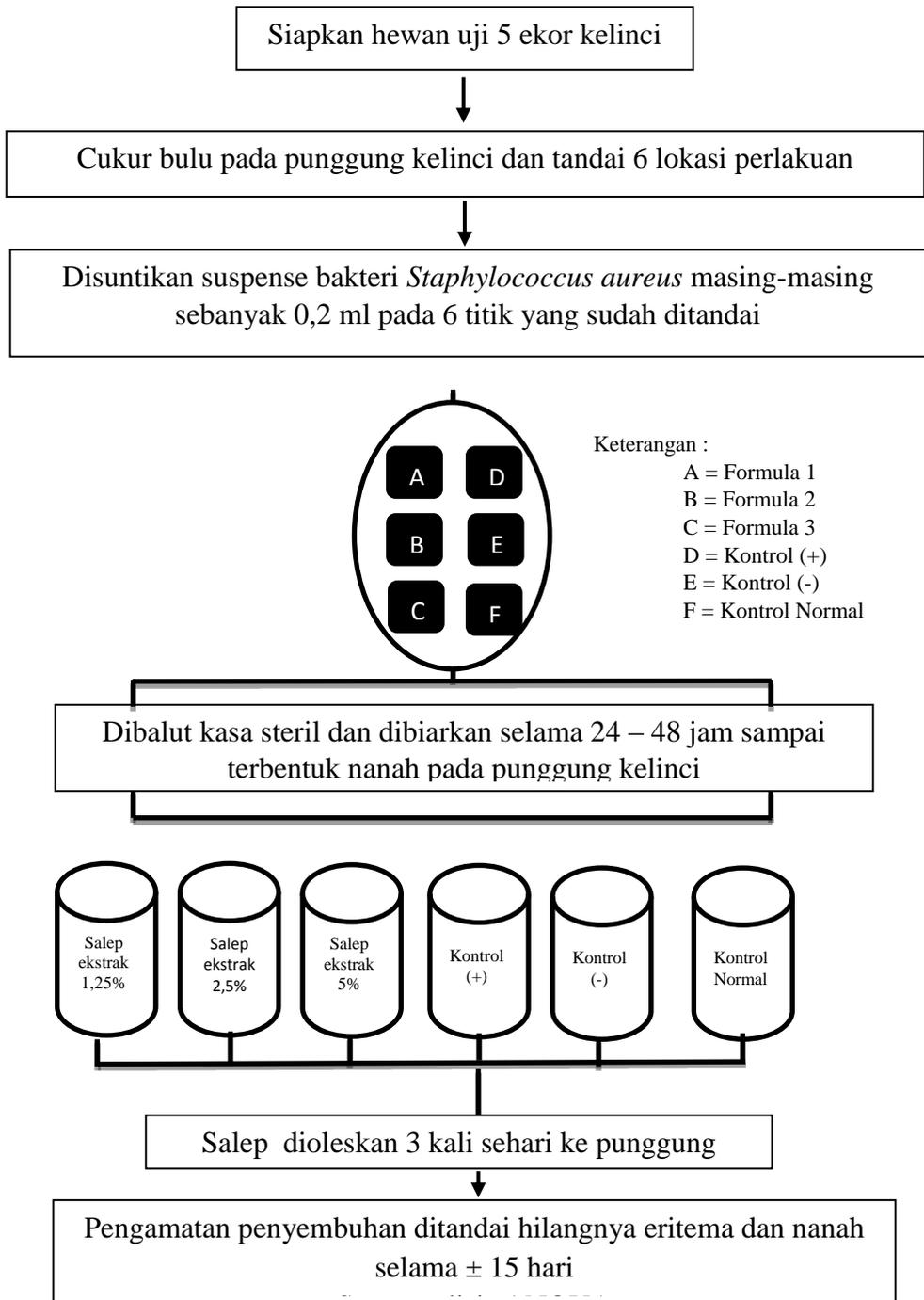
H. Skema Penelitian



Gambar 4. Skema penelitian



Gambar 5. Skema pembuatan salep ekstrak daun salam



Gambar 6. Skema pengujian salep ekstrak etanolik daun salam